Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств дифеноконазола в бананах, цитрусовых (мякоть, сок) и зерне риса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3028—12

Издание официальное

Москва
2013

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств дифеноконазола в бананах, цитрусовых (мякоть, сок) и зерне риса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3028—12

ББК 51.23
О60

О60 **Определение** остаточных количеств дифеноконазола в бананах, цитрусовых (мякоть, сок) и зерне риса методом капиллярной газожидкостной хроматографии: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—22 с.

ISBN 978—5—7508—1194—6

1. Разработаны ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора (В. Н. Ракитский, Т. В. Юдина, М. В. Ларькина, С. К. Рогачева).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 3 июля 2012 г.

4. Введены в действие с момента утверждения.

5. Введены впервые.

ББК 51.23

© **Роспотребнадзор, 2013**
© **Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013**

Содержание

1. Метрологические характеристики 5
2. Метод измерений 6
3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы 7
4. Требования безопасности 10
5. Требования к квалификации операторов 11
6. Условия измерений 11
7. Подготовка к выполнению измерений 11
8. Отбор и хранение проб 15
9. Выполнение определения 16
10. Обработка результатов анализа 19
11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений 19
12. Оформление результатов 20
13. Контроль качества результатов измерений 20

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации,
Г. Г. Онищенко
3 июля 2012 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.1. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. ХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Определение остаточных количеств дифеноконазола в бананах, цитрусовых (мякоть, сок) и зерне риса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

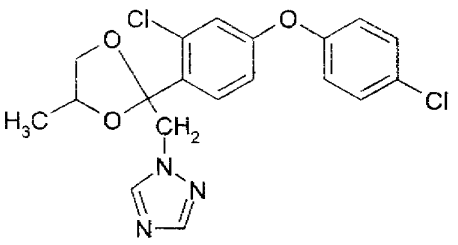
Методические указания
МУК 4.1.3028—12

Свидетельство о метрологической аттестации № 00120.22.05.12 от 22.05.2012

Настоящие методические указания устанавливают метод капиллярной газожидкостной хроматографии для определения массовых концентраций дифеноконазола в бананах, цитрусовых и рисе в диапазоне 0,01—0,1 мг/кг.

Дифеноконазол

4-хлорфениловый эфир *цис, транс*-3-хлор-4-[4-метил-2-(1Н--1,2,4-триазол-1-илметил)-1,3-диоксолан-2-ил]фенила (ИЮПАК)



$C_{19}H_{17}Cl_2N_3O_3$
Мол. масса 406,3

Соотношение *цис* и *транс*-изомеров от 0,7 до 1,5.

Кристаллическое вещество от белого до светло-бежевого цвета. Температура плавления 78,6 °С. Давление паров при 25 °С: $3,3 \cdot 10^{-5}$ мПа. Растворимость в органических растворителях (г/дм³): этанол – 330; н-гек-

сан — 3,4; толуол – 490; ацетон – 610. Растворимость в воде при 20 °С (мг/дм³): 15. Коэффициент распределения н-октанол—вода (20 °С) $K_{ow}logP = 4,2$. Вещество устойчиво к гидролизу и фотолизу (при естественном солнечном свете $DT_{50} = 145$ дней). Дифеноконазол быстро сорбируется почвой и медленно разрушается.

Краткая токсикологическая характеристика

Острая пероральная токсичность (LD_{50}) для крыс – 1 453 мг/кг, мышей – > 2 000 мг/кг; острая дермальная токсичность (LD_{50}) для кроликов > 2 010 мг/кг; острая ингаляционная токсичность (LC_{50}) для крыс > 3 300 мг/дм³ (4 ч). Фунгицид нетоксичен для птиц, пчел и дождевых червей.

Область применения препарата

Дифеноконазол – системный фунгицид и протравитель семян. Обладает длительным защитным и лечебным действием против широкого круга растительных патогенов из классов аскомицетов, базилиомицетов, дейтеромицетов, включая возбудителей альтернариоза, септориоза, церкоспороза, парши и других патогенов.

1. Метрологические характеристики

При соблюдении всех регламентированных условий проведения анализа в точном соответствии с данной методикой погрешность (и её составляющие) результатов измерений при доверительной вероятности P = 0,95 не превышает значений, приведенных в табл. 1 для соответствующих диапазонов концентраций.

Таблица 1

Метрологические параметры

Анализируемый объект	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Показатель точности (граница относительной погрешности), ±δ %, P = 0,95	Стандартное отклонение повторяемости, σ, %	Предел повторяемости, r, %	Предел воспроизводимости, R, %	Норматив оперативного контроля точности, K, мг/кг, (P = 0,95, n = 2)
1	2	3	4	5	6	7
Бананы	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	2,4	8	11	$0,59 \times \overline{X}$
Зерно риса	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	2,9	8	11	$0,59 \times \overline{X}$

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Мякоть цитрусовых	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	2,5	7	10	$0,59\times\overline{X}$
Сок цитрусовых	от 0,01 до 0,1 вкл.	50	2,6	8	11	$0,59\times\overline{X}$
$\overline{X}$ – среднее значение массовой концентрации анализируемого компонента в пробе (мг/кг)						

Полнота извлечения вещества, стандартное отклонение, доверительный интервал среднего результата для всего диапазона измерений (n = 20) приведены в табл. 2.

Таблица 2

Анализируемый объект	Метрологические параметры, P = 0.95, n = 20				
	Предел обнаружения, мг/кг	Диапазон определяемых концентраций, мг/кг	Полнота извлечения вещества, δ %	Стандартное отклонение, δ %	Доверительный интервал среднего результата, ±, %
Бананы	0,01	0,01—0,1	91,48	2,8	1,5
Зерно риса	0,01	0,01—0,1	85,71	3,4	1,8
Мякоть цитрусовых	0,01	0,01—0,1	91,55	3,1	1,7
Сок цитрусовых	0,01	0,01—0,1	93,10	3,3	1,8

2. Метод измерений

Метод основан на экстракции дифеноконазола из исследуемой пробы растворителем, очистке экстрактов от коэкстрактивных компонентов перераспределением их в системе несмешивающихся растворителей, далее на колонке с силикагелем (бананы, цитрусовые (мякоть, сок) и зерно риса) и на концентрирующем патроне Sep Pak Classik C18 (зерно риса, цитрусовые (мякоть и сок) с последующим измерением содержания дифеноконазола методом капиллярной газожидкостной хроматографии (ГЖХ) с электронно-захватным детектором (ЭЗД) при программировании температуры и обработкой хроматограмм методом абсолютной калибровки.

3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы

3.1. Средства измерений

Газовый хроматограф «Кристалл-2000М», снабженный электронно-захватным детектором с пределом детектирования по линдану $3,5 \cdot 10^{-14}$ г/с, предназначенный для работы с капиллярной колонкой	Номер Госреестра 14516—08
Весы аналитические ВЛА-200	ГОСТ 24104—2001
Весы лабораторные общего назначения, с наибольшим пределом взвешивания до 500 г и пределом допустимой погрешности ± 0,038 г	ГОСТ 24104—2001
Колбы мерные вместимостью 2-100-2	ГОСТ 1770—74
Меры массы	ГОСТ 7328—2001
Микрошприц типа SGE-Cromatek, вместимостью 10 мм^3	Номер Госреестра 39206—08
Пипетки градуированные 2-го класса точности вместимостью 1,0; 2,0; 5,0; 10 см^3	ГОСТ 29227—91
Цилиндры мерные 2-го класса точности вместимостью 25, 50, 100 и 250 см^3	ГОСТ 1770—74

Примечание. Допускается использование средств измерения иных производителей с аналогичными или лучшими характеристиками.

3.2. Реактивы

Дифеноконазол, аналитический стандарт с содержанием действующего вещества 99,1% (абсолютное значение погрешности ± 0,9 % (НПК «Блок-1»)	ГСО 7656—99
Азот газообразный нулевой, марка А (99,999%) в баллонах	ТУ 6-21-39—96
Ацетонитрил для хроматографии, осч; УФ-210 нм	ТУ 6-09-14-2167—84

Ацетон, осч	ГОСТ 2603—79
Вода для лабораторного анализа (деионизованная, бидистилированная)	ГОСТ Р 52501—2005
н-Гексан (гексан), для ВЭЖХ	ТУ 6-09-06-657—84
Калий марганцово-кислый (перманганат калия), хч	ГОСТ 20490—75
Калий углекислый (карбонат калия, поташ), хч	ГОСТ 4221—76
Кислота серная концентрированная, хч	ГОСТ 4204—77
Метиловый спирт (метанол), хч	ГОСТ 6995—77
Натрий серно-кислый (сульфат натрия) безводный, хч	ГОСТ 4166—76
Натрий углекислый (карбонат натрия), хч	ГОСТ 83—79
Натрий хлористый, хч, насыщенный водный раствор	ГОСТ 4233—77
Фосфор (V) оксид (фосфорный ангидрид, пентоксид фосфора)	ТУ 6-09-4173—85
Эфир диэтиловый, чистый для анализа	ТУ 2600-001-45682126—11

Примечание. Допускается использование реактивов иных производителей с более высокой квалификацией.

3.3. Вспомогательные устройства, материалы

Алюминия окись II	
Аппарат для встряхивания типа АВУ-6с	ТУ 64-1-2851—78
Баня ультразвуковая фирмы Донау (Швейцария)	
Барометр-анероид с диапазоном измерений от 79,5 до 106,5 и ценой деления 0,1 кПа, типа М-98	ТУ 25-11-1316—76
Бумажные фильтры «красная лента», обеззоленные или фильтры из хроматографической бумаги Ватман 3ММ	ТУ 2642-001-05015242—07

Воронка Бюхнера	ГОСТ 9147—80
Воронка делительная вместимостью 250 см³	ГОСТ 9737—93
Воронки стеклянные конусные типа В-36-80 ХС и В-56-80 ХС	ГОСТ 25336—82
Гигрометр с диапазоном измерений относительной влажности от 30 до 90 %, типа ВИТ-2	ТУ 25-11-1645—84
Груша резиновая	ТУ9398-05-0576-9082—2003
Колба Бунзена	ГОСТ 25336—82
Колбы конические (плоскодонные) вместимостью 100, 250—300 см³	ГОСТ 23932—90
Колбы круглодонные на шлифе (для упаривания) вместимостью 10, 100, 250 см³	ГОСТ 9737—93
Колонка стеклянная для препаративной хроматографии, длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм	
Концентрирующий патрон Sep Pak Classik C18 Cartidges(360 mg), (Waters, США)	
Мельница электрическая бытовая	ГОСТ Р 52161.1—2004
Насос водоструйный вакуумный	ГОСТ 25336—82
Стаканы химические, вместимостью 100, 250 см³	ГОСТ 25336—82
Силикагель для колоночной хроматографии, 0,2—0,5 мм, 40 А	
Стекловата	
Стеклянные палочки	
Термометр с диапазоном измерений от 0 до 55 °С и ценой деления 0,1 °С	ГОСТ 28498—90
Ректификационная колонна с числом теоретических тарелок не менее 30	

Ротационный вакуумный испаритель В-169 фирмы Buchi, Швейцария	
Установка для перегонки растворителей	
Хроматографическая колонка капиллярная НР-35, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщина пленки сорбента 0,5 мкм	
Шприц медицинский с разъемом Льюера вместимостью 10 см^3	ГОСТ 22090

Примечание. Допускается использование других вспомогательных средств измерений и устройств иных производителей, технические характеристики которых не уступают указанным, а также материалов, обеспечивающих нормативы точности при проведении измерений.

4. Требования безопасности

4.1. При выполнении измерений необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.1.007—76, требования по электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019—09, а также требования, изложенные в технической документации на газовый хроматограф.

4.2. Помещение должно соответствовать требованиям пожаробезопасности по ГОСТ 12.1.004—91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009—83. Содержание вредных веществ в воздухе не должно превышать норм, установленных ГН 2.2.5.1313—03 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны» и ГН 2.2.5.2308—07 «Ориентировочные безопасные уровни воздействия (ОБУВ) вредных веществ в воздухе рабочей зоны». Организация обучения работников безопасности труда – по ГОСТ 12.0.004—90.

4.3. При работе с газами, находящимися в баллонах под давлением до 15 МПа (150 кгс/см^2), необходимо соблюдать «Правила устройства и безопасной эксплуатации стационарных компрессорных установок, воздухопроводов и газопроводов под давлением», ПБ-03-576—03. Запрещается открывать вентиль баллона, не установив на нем понижающий редуктор.

5. Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений допускают специалиста, имеющего квалификацию не ниже лаборанта-исследователя, с опытом работы на газовом хроматографе, освоившего данную методику и подтвердившего экспериментально соответствие получаемых результатов нормативам контроля погрешности измерений по п. 13.

К проведению пробоподготовки допускают оператора с квалификацией «лаборант», имеющего опыт работы в химической лаборатории.

6. Условия измерений

При выполнении измерений соблюдают следующие условия:

- процессы приготовления растворов и подготовки проб к анализу проводят при температуре воздуха (20 ± 5) °С и относительной влажности не более 80 %;
- выполнение измерений на газовом хроматографе проводят в условиях, рекомендованных технической документацией к прибору.

7. Подготовка к выполнению измерений

Измерениям предшествуют следующие операции: очистка органических растворителей (при необходимости), приготовление градуировочных растворов, растворов внесения, установление градуировочной характеристики, приготовление смесей растворителей для очистки экстрактов на колонке, подготовка колонки с силикагелем, проверка хроматографического поведения дифеноконазола на ней, подготовка концентрирующих патронов Sep Pak Classik C18, проверка поведения вещества на них.

7.1. Очистка органических растворителей

7.1.1. Ацетон

Ацетон перегоняют над небольшим количеством марганцевокислого калия и прокаленным карбонатом калия или подвергают ректификационной перегонке на колонне с числом теоретических тарелок не менее 30.

7.1.2. н-Гексан

Растворитель последовательно промывают порциями концентрированной серной кислоты, до тех пор, пока она не перестанет окрашиваться в желтый цвет, затем водой до нейтральной реакции промывных вод, перегоняют над прокаленным карбонатом калия.

7.1.3. Ацетонитрил

Ацетонитрил кипятят с обратным холодильником над пентоксидом фосфора (на 1 дм³ ацетонитрила – 20 г пентоксида фосфора) не менее 1 часа, после чего перегоняют, непосредственно перед употреблением ацетонитрил повторно перегоняют над прокаленным карбонатом калия (на 1 дм³ ацетонитрила – 10 г карбоната калия).

7.1.4. Диэтиловый эфир

Растворитель проверяют на присутствие перекисей. Перекись удаляют путем пропускания растворителя через короткую колонку (диаметр колонки 3—4 см, высота сорбента 5—6 см), наполненную окисью алюминия. Применение активированной окиси алюминия позволяет одновременно высушивать растворитель.

7.2. Приготовление градуировочных растворов

7.2.1. Исходный раствор дифеноконазола для градуировки (концентрация 250 мкг/см³). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,025 г дифеноконазола, растворяют в 50—70 см³ смеси гексан : ацетон (8 : 2, по объему), доводят до метки этой же смесью, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 3-х месяцев.

7.2.2. Раствор № 1 дифеноконазола для градуировки (концентрация 2,5 мкг/см³). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 1,0 см³ исходного раствора дифеноконазола для градуировки с концентрацией 250 мкг/см³ (п. 7.2.1), доводят до метки смесью гексан : ацетон (8 : 2, по объему), тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.2.3. Рабочие растворы № 2—5 дифеноконазола для градуировки (концентрация 0,025—0,25 мкг/см³).

В 4 мерные колбы вместимостью 100 см³ помещают по 1,0; 2,0; 4,0 и 10 см³ раствора № 1 дифеноконазола с концентрацией 2,5 мкг/см³ (п. 7.2.2), доводят до метки смесью гексан : ацетон (8 : 2, по объему), тщательно перемешивают, получают рабочие растворы № 2—5 с концентрацией дифеноконазола 0,025; 0,05; 0,1 и 0,25 мкг/см³, соответственно.

Растворы № 2—5 готовят непосредственно перед использованием.

7.3. Установление градуировочной характеристики

Градуировочную характеристику, выражающую зависимость площади пика (S, мВ · сек) от концентрации дифеноконазола в

растворе (мкг/см³), устанавливают методом абсолютной калибровки по 4 растворам для градуировки № 2—5.

В инжектор хроматографа вводят 1 мм³ каждого градуировочного раствора и анализируют в условиях хроматографирования по п. 9.5. Осуществляют не менее 5 параллельных измерений.

Устанавливают площади пиков действующего вещества, на основании которых строят градуировочную зависимость.

7.4. Приготовление смесей для приготовления градуировочных растворов и очистки экстрактов на колонке

7.4.1. Смесь гексан : ацетон (объемное соотношение 8 : 2). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 80 см³ гексана и 20 см³ ацетона, перемешивают.

7.4.2. Смесь гексан : ацетон (объемное соотношение 95 : 5). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 95 см³ гексана и 5 см³ ацетона, перемешивают.

7.4.3. Смесь гексан : ацетон (объемное соотношение 9 : 1). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 90 см³ гексана и 10 см³ ацетона, перемешивают.

7.4.4. Смесь гексан : ацетон (объемное соотношение 7 : 3). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 70 см³ гексана и 30 см³ ацетона, перемешивают.

7.4.5. Смесь гексан : диэтиловый эфир (объемное соотношение 4 : 1). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 80 см³ гексана и 20 см³ диэтилового эфира, перемешивают.

7.5. Приготовление смесей для очистки экстрактов на концентрирующем патроне Sep Pak Classik C18

7.5.1. Смесь ацетонитрил : вода (объемное соотношение 1 : 9). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 10 см³ ацетонитрила и 90 см³ воды, перемешивают.

7.5.2. Смесь ацетонитрил : вода (объемное соотношение 2 : 8). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 20 см³ ацетонитрила и 80 см³ воды, перемешивают.

7.5.3. Смесь ацетонитрил : вода (объемное соотношение 3 : 7). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 30 см³ ацетонитрила и 70 см³ воды, перемешивают.

7.5.4. Смесь ацетонитрил : вода (объемное соотношение 1 : 1). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 50 см³ ацетонитрила и 50 см³ воды, перемешивают.

7.6. Приготовление растворов внесения

7.6.1. Исходный раствор дифеноконазола для внесения (концентрация 100 мкг/см³). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 0,01 г дифеноконазола, растворяют в 50—70 см³ ацетона, доводят им до метки, тщательно перемешивают. Раствор хранится в холодильнике в течение 3 месяцев.

7.6.2. Раствор № 1 дифеноконазола для внесения (концентрация 5 мкг/см³). В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают 5,0 см³ исходного раствора дифеноконазола для внесения с концентрацией 100 мкг/см³ (п. 7.6.1), доводят до метки ацетоном, тщательно перемешивают.

Раствор хранится в холодильнике в течение месяца.

7.7. Подготовка колонки с силикагелем

Нижнюю часть стеклянной колонки длиной 25 см, внутренним диаметром 10—12 мм уплотняют тампоном из стекловаты, медленно выливают в колонку (при открытом кране) суспензию 4 г силикагеля в 20 см³ гексана. Дают растворителю стечь до верхнего края сорбента, на который помещают слой безводного сульфата натрия высотой 1 см. Колонку последовательно промывают 15 см³ смеси гексан : ацетон в объемном соотношении 9 : 1, скорость прохождения растворителя 1—2 капли в секунду, после чего она готова к работе.

7.8. Подготовка концентрирующего патрона Sep Pak Classik C18 для очистки экстрактов

Концентрирующий патрон Sep Pak Classik C18 промывают последовательно с помощью медицинского шприца 5 см³ метанола и 10 см³ воды со скоростью 5 см³/мин. Нельзя допускать высыхания поверхности патрона.

7.9. Проверка хроматографического поведения дифеноконазола на колонке с силикагелем

В круглодонную колбу вместимостью 10 см³ помещают 2,0 см³ раствора № 5 дифеноконазола для градуировки с концентрацией 0,25 мкг/см³ (п. 7.2.3), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси гексан : ацетон (8 : 2, по объему), помещая на ультразвуковую баню на 40—60 с, и наносят на колонку, подготовленную по п. 7.7. Колбу обмывают дважды этой же смесью растворителей, порциями по 5 см³, которые также наносят на колонку. Скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли

в секунду. Промывают колонку 20 см³ смеси гексан : ацетон в объемном соотношении 9 : 1, элюат отбрасывают.

Затем колонку промывают 70 см³ смеси гексан : ацетон (7 : 3, по объему) со скоростью 1—2 капли в секунду. Фракционно (по 10 см³) отбирают элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см³ смеси гексан : ацетон (8 : 2, по объему), анализируют содержание дифеноконазола по п. 9.5.

Фракции, содержащие дифеноконазол, объединяют и вновь анализируют.

Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с колонки и необходимый для очистки объем элюента.

Примечание. Проверку хроматографического поведения дифеноконазола следует проводить обязательно, поскольку профиль вымывания может изменяться при использовании новой партии сорбентов и растворителей.

7.10. Проверка поведения дифеноконазола на концентрирующем патроне Sep Pak Classik C18

В круглодонную колбу вместимостью 10 см³ помещают 2,0 см³ раствора № 5 дифеноконазола для градуировки с концентрацией 0,25 мкг/см³ (п. 7.2.3), упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре водяной бани не выше 35 °С. Сухой остаток растворяют в 1 см³ ацетонитрила, помещая на ультразвуковую баню на 40—60 с, затем добавляют 9,0 см³ деионизованной воды, перемешивают и наносят на подготовленный концентрирующий патрон Sep Pak Classik C18 (п. 7.8). Патрон промывают 10 см³ смеси ацетонитрил-вода (1 : 9, по объему), 10 см³ смеси ацетонитрил : вода (2 : 8, по объему), 10 см³ смеси ацетонитрил : вода (объемное соотношение 3 : 7), элюаты отбрасывают.

Дифеноконазол элюируют с патрона 20 см³ смеси ацетонитрил : вода (1 : 1, по объему), отбирая фракционно (по 5 см³) элюат, упаривают, остатки растворяют в 2 см³ смеси гексан : ацетон (8 : 2, по объему), анализируют содержание дифеноконазола по п. 9.5.

Фракции, содержащие дифеноконазол, объединяют и вновь анализируют. Устанавливают уровень вещества в элюате, определяют полноту смывания с патрона и необходимый для очистки объем элюента.

8. Отбор и хранение проб

Отбор проб производится в соответствии с правилами, определенными ГОСТ: ГОСТ 4427—82 «Апельсины. Технические условия»; ГОСТ 4428—82 «Мандарины. Технические условия»; ГОСТ 4492—82 «Лимоны. Технические условия»; ГОСТ 26313—84 «Про-

дукты переработки плодов и овощей. Правила приемки, методы отбора проб»; ГОСТ 6293—90 «Рис. Требования при заготовках и поставках» и «Унифицированными правилами отбора проб сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктов и объектов окружающей среды для определения микроколичеств пестицидов» (№ 2051—79 от 21.08.79).

Отобранные пробы цитрусовых и бананов хранят в стеклянной или полиэтиленовой таре в холодильнике не более 1 недели. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Рис подсушивают в темноте до постоянного веса и хранят в тканевых мешочках в сухом, защищенном от света месте при комнатной температуре не более месяца. Для длительного хранения образцы замораживают и хранят при температуре –18 °С.

Пробы сока цитрусовых анализируют в день изготовления.

Перед анализом образцы измельчают с помощью гомогенизатора.

9. Выполнение определения

9.1. Экстракция

9.1.1.Бананы, цитрусовые (мякоть и сок)

Измельченные образцы исследуемых продуктов массой 25 г вносят в коническую колбу на 250—300 см³, добавляют 100 см³ ацетона, интенсивно встряхивают вручную в течение 3 мин и помещают на аппарат для встряхивания на 40 мин, затем в течение 3 мин выдерживают на ультразвуковой бане.

Пробам дают отстояться, затем надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр «красная лента». В коническую колбу с пробой вносят новые порции экстрагента объемом 50 см³ и повторно экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 20 мин, затем на ультразвуковой бане в течение 1 мин, после чего раствор фильтруют на воронке Бюхнера. Фильтр промывают ацетоном, порцией 30 см³.

Экстракт и промывную жидкость помещают в мерный цилиндр на 250 см³, отбирают $^1/_5$ экстракта (эквивалентную 5 г образца), переносят в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 250 см³ и добавляют 30 см³ деионизованной воды. Раствор упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С до водного остатка. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.

9.1.2. Зерно риса

Измельченные образцы риса массой 25 г вносят в коническую колбу на 250—300 см³, добавляют 100 см³ смеси ацетон : вода (8 : 2, по объему), после встряхивания вручную в течение 3 мин помещают на аппарат для встряхивания на 40 мин, затем в течение 3 мин выдерживают на ультразвуковой бане.

Пробам дают отстояться, надосадочную жидкость фильтруют на воронке Бюхнера с помощью разряжения, создаваемого водоструйным насосом, через двойной фильтр «красная лента». В коническую колбу с пробой вносят новые порции экстрагента объемом 50 см³ и повторно экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 20 мин, затем на ультразвуковой бане в течение 1 мин, после чего раствор фильтруют на воронке Бюхнера. Фильтр промывают ацетоном, порцией 30 см³.

Экстракт и промывную жидкость помещают в мерный цилиндр на 250 см³, отбирают $^1/_5$ экстракта (эквивалентную 5 г образца), переносят в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 250 см³ и добавляют 30 см³ деионизованной воды. Раствор упаривают на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С до водного остатка. Далее проводят очистку экстракта по п. 9.2.

9.2. Очистка экстракта перераспределением в системе несмешивающихся растворителей

Водный остаток, полученный по пп. 9.1.1 или 9.1.2 переносят в делительную воронку вместимостью 250 см³. Колбу ополаскивают 10 см³ деионизованной воды, которую также переносят в делительную воронку. Вносят в воронку 15 см³ насыщенного водного раствора хлористого натрия и 30 см³ смеси гексан–диэтиловый эфир (объемное соотношение 4 : 1). Содержимое воронки интенсивно встряхивают в течение 2—3 мин. После полного разделения слоев, верхний органический слой (гексан–диэтиловый эфир) фильтруют через слой безводного сульфата натрия в колбу для упаривания вместимостью 100 см³. Водную фракцию возвращают и дважды повторяют экстракцию новыми порциями по 25 см³ смеси гексан–диэтиловый эфир (4 : 1, по объему).

Объединенный органический экстракт, пропущенный через безводный сульфат натрия, упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре бани не выше 35 °С. Сухой остаток подвергают дополнительной очистке на колонке с силикагелем по п. 9.3.

9.3. Очистка экстракта на колонке с силикагелем

Сухой остаток, полученный по п. 9.2, находящийся в колбе для упаривания, растворяют в 5,0 см³ смеси гексан–ацетон (95 : 5, по объему), наносят на колонку с силикагелем, подготовленную по п. 7.6. Колбу ополаскивают дважды порциями смеси гексан–ацетон по 2,5 см³, которую наносят на колонку, скорость прохождения растворителя через колонку – 1—2 капли в секунду. Промывают колонку 20 см³ смеси гексан–ацетон в объемном соотношении 9 : 1, элюат отбрасывают.

Дифеноконазол элюируют с колонки 70 см³ смеси гексан–этилацетат в объемном соотношении 7 : 3 со скоростью 1—2 капли в секунду, собирая элюат в круглодонную колбу вместимостью 150 см³, раствор упаривают досуха при температуре не выше 35 °С. При анализе проб бананов сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси гексан–ацетон (8 : 2; по объему), помещают в ультразвуковую баню на 40—60 с и анализируют содержание дифеноконазола методом ГЖХ по п. 9.5.

Пробы зерна риса, цитрусовых (мякоть и сок) подвергают дополнительной очистке на концентрирующем патроне Sep Pak Classik по п. 9.4.

9.4. Очистка экстракта на концентрирующем патроне Sep Pak Classik C18 (зерно риса, цитрусовые (мякоть и сок)

Сухой остаток в круглодонной колбе, полученный по п. 9.3, растворяют с помощью ультразвуковой бани в 1 см³ ацетонитрила, затем добавляют 9,0 см³ деионизованной воды, перемешивают и переносят на подготовленный концентрирующий патрон Sep Pak Classik C18 (п. 7.8). Патрон промывают 10 см³ смеси ацетонитрил–вода (1 : 9, по объему), 10 см³ смеси ацетонитрил–вода (2 : 8, по объему), 10 см³ смеси ацетонитрил–вода (объемное соотношение 3 : 7), элюаты отбрасывают. Дифеноконазол элюируют 10 см³ смеси ацетонитрил–вода (1 : 1, по объему) в круглодонную колбу для упаривания вместимостью 25 см³. Раствор упаривают досуха на ротационном вакуумном испарителе при температуре не выше 40 °С. Сухой остаток растворяют в 2 см³ смеси гексан–ацетон (8 : 2, по объему) и анализируют содержание дифеноконазола по п 9.5.

9.5. Условия хроматографирования

Газовый хроматограф, снабженный электронно-захватным детектором.

Колонка капиллярная HP-35, длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм, толщина пленки сорбента 0,5 мкм.

Температура: детектора – 320 °С, испарителя – 290 °С.

Температура термостата колонки программированная. Начальная температура – 230 °С, выдержка 1 мин, нагрев колонки со скоростью 10 градусов в минуту до температуры 260 °С, выдержка 2 мин, нагрев колонки со скоростью 15 °/мин до температуры 295 °С.

Газ 1 (азот): давление 100 кПа, 40,27 см/с, поток 1,782 см³/мин.

Газ 2 (азот): деление потока 1 : 3; сброс 6,9 см³/мин.

Хроматографируемый объем: 1 мм³.

Ориентировочное время выхода дифеноконазола: 17 мин 46 с — 17 мин 50 с.

Линейный диапазон детектирования: 0,025—0,25 нг.

Образцы, дающие пики большие, чем градуировочный раствор с концентрацией 0,25 мкг/см³, разбавляют смесью гексан–ацетон (8 : 2, по объему), не более, чем в 50 раз.

10. Обработка результатов анализа

Содержание дифеноконазола в пробе (X, мг/кг) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{C \times V}{m}, \text{ где}$$

C – концентрация дифеноконазола, найденная по градуировочной характеристике в соответствии с величиной площади хроматографического пика, мкг/см³;

V – объем экстракта, подготовленного для хроматографирования, см³;

m – объем (масса) анализируемого образца, см³ (г).

11. Проверка приемлемости результатов параллельных определений

За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает предела повторяемости (1):

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{X_1 + X_2} \le r, \text{ где} \qquad (1)$$

X_1, X_2 – результаты параллельных определений, мг/кг;

r – значение предела повторяемости (табл. 1), при этом $r = 2{,}8\,\sigma_r$.

При невыполнении условия (1) выясняют причины превышения предела повторяемости, устраняют их и вновь выполняют анализ.

12. Оформление результатов

Результат анализа представляют в виде:

$\left(\overline{X} \pm \Delta\right)$ мг/кг при вероятности P = 0,95, где

$\overline{X}$ – среднее арифметическое результатов определений, признанных приемлемыми, мг/кг;

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг.

$$\Delta = \frac{\delta \times X}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Если содержание компонента менее нижней границы диапазона определяемых концентраций, результат анализа представляют в виде:

«содержание дифеноконазола в пробах бананов, зерна риса, цитрусовых (мякоть и сок) менее – 0,01 мг/кг».

13. Контроль качества результатов измерений

Оперативный контроль погрешности и воспроизводимости измерений осуществляется в соответствии с ГОСТ Р ИСО 5725-1-6—2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

13.1. Контроль стабильности градуировочной характеристики

Контроль стабильности градуировочной характеристики проводят в начале и по окончании каждой серии анализов.

При контроле стабильности градуировочной характеристики проводят измерения не менее трех образцов концентраций для градуировки, содержание дифеноконазола в которых должно охватывать весь диапазон концентраций от 0,025 до 0,25 мкг/см³.

---

* 0,01 мг/кг – предел обнаружения дифеноконазола в пробах бананов, зерна риса, цитрусовых (мякоть и сок) соответственно.

Градуировочная характеристика считается стабильной, если для каждого из используемого для контроля градуировочного раствора сохраняется соотношение:

$$A = \frac{(X - C) \times 100}{C} \leq 10, \text{ где}$$

X – концентрация дифеноконазола в пробе при контрольном измерении, мкг/см³;

C – известная концентрация градуировочного раствора дифеноконазола, взятая для контроля стабильности градуировочной характеристики, мкг/см³;

10 – погрешность градуировочной характеристики, %.

Если величина расхождения (А) превышает 10 %, делают вывод о невозможности применения градуировочной характеристики для дальнейших измерений. В этом случае выясняют и устраняют причины нестабильности градуировочной характеристики и повторяют контроль ее стабильности с использованием других градуировочных растворов дифеноконазола, предусмотренных МВИ. При повторном обнаружении нестабильности градуировочной характеристики устанавливают ее заново согласно п. 7.3.

Стабильность результатов измерений контролируют перед проведением измерений, анализируя один из градуировочных растворов.

13.2. Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа

Плановый внутрилабораторный оперативный контроль процедуры выполнения анализа проводится методом добавок.

Величина добавки $C_д$ должна удовлетворять условию:

$$C_д \geq \Delta_{л,\bar{X}} + \Delta_{л,\bar{X}'}, \text{ где}$$

$\pm\Delta_{л,\bar{X}}\left(\pm\Delta_{л,\bar{X}'}\right)$ – характеристика погрешности (абсолютная погрешность) результатов анализа, соответствующая содержанию компонента в испытуемом образце (расчетному значению содержания компонента в образце с добавкой соответственно), мг/кг, при этом:

$$\Delta_л = \pm 0{,}84\Delta, \text{ где}$$

Δ – граница абсолютной погрешности, мг/кг.

$$\Delta = \frac{\delta \times X}{100}, \text{ где}$$

δ – граница относительной погрешности методики (показатель точности, табл. 1), %.

Контрольный параметр процедуры $K_к$ рассчитывают по формуле:

$$K_к = \overline{X'} - \overline{X} - C_д \text{ , где}$$

$\overline{X'}, \overline{X}, C_д$ – среднее арифметическое результатов параллельных определений (признанных приемлемыми по п. 11) содержания компонента в образце с добавкой, испытуемом образце, концентрация добавки, соответственно, мг/кг.

Норматив контроля K рассчитывают по формуле

$$K = \sqrt{\Delta^2_{л.\overline{X'}} + \Delta^2_{л.\overline{X}}}$$

Проводят сопоставление результата контроля процедуры ($K_к$) с нормативом контроля (K).

Если результат контроля процедуры удовлетворяет условию

$$|K_к| \le K, \qquad (2)$$

процедуру анализа признают удовлетворительной.

При невыполнении условия (2) процедуру контроля повторяют. При повторном невыполнении условия (2) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и принимают меры по их устранению.

13.3. Проверка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости

Расхождение между результатами измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), не должно превышать предела воспроизводимости (R)

$$\frac{2 \cdot |X_1 - X_2| \cdot 100}{(X_1 + X_2)} \le R \text{ , где} \qquad (3)$$

X_1, X_2 – результаты измерений, выполненных в условиях воспроизводимости (разное время, разные операторы, разные лаборатории), мг/кг;

R – предел воспроизводимости (в соответствии с диапазоном концентраций, табл. 1), %.

Определение остаточных количеств дифеноконазола в бананах, цитрусовых (мякоть, сок) и зерне риса методом капиллярной газожидкостной хроматографии

Методические указания
МУК 4.1.3028—12

Редактор Н. В. Кожока

Технический редактор А. А. Григорьев

Подписано в печать 28.03.13

Формат 60×88/16 Печ. л. 1,5
Тираж 200 экз. Заказ 20

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 8 (495) 952-50-89

gost.e-ecolog.ru